第6卷 第4期增刊 动物学研究 Vol.6, No.4 Sup.
1985年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1985

一种长期维持四膜虫种源的方法

沈锡祺 张作人

（华东师范大学生物学系 上海）

摘 要

平菇 *Pleurotus ostreatus*（一种人工栽培的食用真菌）的水提取液作为长期维持梨形四膜虫*Tetrahymena pyriformis*种源的培养液。在这种培养液中接入对数生长的四膜虫，并在它的上面复盖一层液体石腊油，置室温（温度变化范围为8—30°C）下维持达到一年以上。

用这种方法维持一年后的四膜虫，细胞大小和细胞大核直径都要比在丰富有机培养基中正常生长的对数期细胞要小一些，除外，没有其它明显的形态变化。

用这种方法维持一年后的四膜虫，只需经过一次转接到丰富有机培养基中，其细胞大小、细胞大核直径就能恢复到正常情况，但是转接后发现有较长的停滞期。

关键词 梨形四膜虫 维持方法 维持培养基 平菇

长期维持原生动物种源是一个重要的课题，这对于维持纯系品种，对于进行科研和教学等方面都是有一定价值的。由于四膜虫繁殖迅速，在最适条件下大约每2.5—3小时可以分裂一次；只需进行无菌培养，就能得到数量较多的实验材料；这种原虫个体长度有几十微米，直接可以从细胞、亚细胞水平上进行各种研究。因此四膜虫广泛地被应用到细胞生物学、遗传学、生物化学及分子生物学等研究中。所以长期维持四膜虫种源尤为重要。国外，Norman E. Williams 等人（1980）报道了用老鼠肠子和大豆，分别经过高压灭菌等处理，作为长期维持四膜虫的培养液，对几个种的四膜虫进行了研究。在用老鼠肠子的培养液中，可以维持四膜虫活体达一年以上，而用大豆作为培养液时维持四膜虫只有六个月。我们用平菇水提取液作为四膜虫培养液，并成功地进行了四膜虫的无菌培养（沈锡祺，1983），培养的四膜虫存活时间比较长。这种情况，可能和平菇具有丰富的营养成分，尤其是和富有四膜虫生长所必须的多种氨基酸有关。继而，我们试用这种培养液作为长期维持四膜虫种源的培养液。结果四膜虫在这种培养液中维持一年以

本文1983年11月4日收到，1984年5月7日收到修改稿。

上，除体形小一些外，没有见到其它明显的变化，只要转接一次到有机培养基中就趋于正常。本文主要介绍这种长期维持四膜虫种源的方法和得到的初步结果。

材料和方法

原生动物四膜虫 是本室采集、克隆培养，再经无菌处理进行无菌培养的。经北京大学生物学系曾同庚等人（1982）定种为 *Tetrahymena pyriformis*, strain S 1。在丰富有机培养基中28°C恒温培养。取对数期生长的四膜虫接种到长期维持其种源的培养液中。

长期维持四膜虫种源培养液 采用平菇水提取液（沈锡祺，1983），加蒸馏水稀释一倍以及不稀释的两种。分别装试管，每支5毫升，15磅蒸气消毒20分钟，冷却，在接入四膜虫（0.3—0.5毫升）后，其液面上再加消过毒的、大约1厘米厚的液体石腊油。最后置室温（温度变化范围8—30°C）保存。

细胞大小、细胞大核直径测定 细胞经升汞固定，孚尔根染色、制片等后，在显微镜下应用测微尺测量其大小（郑国锠，1979）。

结果与讨论

在温度变化范围较大的情况下，平菇长期维持四膜虫种源的培养液，能够维持四膜虫活体达一年以上。在两种培养液（稀释一倍和未稀释的）中维持一年后的四膜虫和在丰富有机培养液中对数生长期的四膜虫，细胞大小、细胞大核直径分别测得的结果如表1所示。

Table 1 Cell size macronucleic dia of Tetrahymena grow in organic medium and maintaining for 1 year*

	mean cell size(μm)		macronucleic dia. (μm)
	length	width	
Tetrahymena of log phanse in rich organic medium	50.0	30.1	9.3
Tetrahymena maintaining 1 year in conc. Pleurotus ostreatus extraction	38.2	26.1	8.0
Tetrahymena maintaining 1 year in dilute Pleurotus ostreatus extraction	38.0	26.0	8.0
Tetrahymena maintaining 1 year, then inoculated into rich organic medium (log phase)	49.3	29.7	9.1

* mean value of randomly collecting 10 organisms

从表1中可以看出，长期维持在两种平菇培养液中达一年以上的四膜虫，它的大小、细胞大核的直径基本上一致；但都要比在丰富有机培养液中对数生长的四膜虫相应地小些；但是维持一年的四膜虫，只要经过一次转接到丰富有机培养液中，除了观察到有比较长的停滞期（大约为正常的2—3倍时间）外，进入对数生长后，其大小、大核直径都趋于一致。这些现象可能是由于四膜虫长期处于十分缓慢的代谢状态、而且是长期处于缺氧或几乎无氧状态下，体内物质大量消耗而合成却很少，从而细胞体积减小，这可能类似于饥饿细胞的某些相似现象（Yoshinori Nozaha等人，1979）。一旦这种细胞进入丰富有机营养液中，尤其是接触到足够的氧气，要有一个适应或恢复过程，同时由于体内已经相当"亏空"，必须要有一个补充和合成过程，因此停滞期时间就增长了。

维持一年的四膜虫活体，在制片过程中发现其细胞质膜比较脆弱、容易破碎等现象。这也可能相似于饥饿细胞，膜上某些甘油酯及其脂类部分地被消耗掉，改变了膜的化学组成的缘故。因此，对长期维持的活体虫子，需要进一步研究其化学组成的变化。

在四膜虫平菇长期维持的培养液上，加上一层大约一厘米厚的液体石腊油是非常重要的。除了Norman E. Williams 等人（1980）指出"防止培养液水分的长期蒸发"外，我们认为使四膜虫不接触氧气也许是更重要的。因为四膜虫是喜氧生物，平常培养时都集中液面，如果它们接触空气，就必然加速它们的新陈代谢的速率，伴随着培养液中营养物的迅速消耗及其本身代谢产物的增加，因而加速了它们本身的衰亡。加了一层石腊油后，防止了长时间的水分蒸发，大大减少或隔绝了四膜虫与氧气的接触，很大地降低了代谢速率，主要靠缺氧条件下的代谢活动来维持它们活体缓慢的生命活动，大大地减少了对营养物的要求，本身代谢产物也大量减少，从而可以长期维持它们的生命活动得以长期保存。

平菇水提取液可作长期维持四膜虫种源的一种培养液，是一种简而易行的方法。作者还认为，其它含氮丰富的物质，特别是富含多种氨基酸等营养成分的动、植物材料，也可能试作长期维持某些原生动物种源的培养液。另外，有人（野泽义则，1981）介绍和总结了一些纤毛原虫的长期保藏活体方法，其中用液氮低温保藏某些纤毛虫，这是一种冷冻休克的方法，如果有条件的地方也是可以采用的。

对于维持一年以上的活体四膜虫，在细胞内生物大分子的组成上有什么变化，需要进一步研究，也是解释上述结果具有充分根据和关键性的作用。

参 考 文 献

沈锡祺　1983　华东师范大学学报（自然科学版）　2：103—106

曹同庚　罗泽华　李莳蓍　1982　《中国原生动物学会第一次学术讨论会论文摘要汇编》：　15—16。华东师范大学出版社

郑国锠　1979　《生物显微技术》：185—189。人民教育出版社

野泽义则　1981　《原生动物细胞》（日文）：20—24。讲谈社

Norman E. Williams, Jason Wolee & Lea K. Bleyman, 1980 *J. Protozool.* 27(3)327

Yoshinori Nozaha & Guy A. Thompson Jr., 1979 in "Biochemistry and Physiology of Protozoa" 2 nd edi vol:2 269 Academic press New York

A LONG-TERM MAINTENANCE METHOD FOR *TETRAHYMENA*

Shen Xiqi Zhang Zuoren (Tchang Tso-ren)

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai)

A simple medium for *Tetrahymena pyriformis*, using *Pleurotus ostreatus*, a species of mushroom, as the nutrient source is described. The medium was placed into each tube 5ml, after autoclaved, inoculated with *T. pyriformis*, and layered over with 2ml of paraffin oil, finally, kept at 8—30°C. *T. pyriformis* in the medium can be maintained more than one year.

T. pyriformis maintained for one year is smaller both in cell size and macronucleic diameter than cells grown in organic medium.

Once *T. pyriformis* maintained with this method was inoculated into usual organic medium, the size of cell and macronucleic diameter was recovered to the same as the normal cells, only their log-phase is longer than normal culture.

Key words *Tetrahymena pyriformis*
Maintenanace method
Maintenanace medium
Pleurotus ostreatus